

AH



SPECIFICATION

SECRETION PROMOTERS OF APOLIPO PROTEIN E

5 FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to a pharmaceutical composition for promoting the secretion of apolipoprotein E (hereinafter referred to as ApoE); to a method for promoting the same, and to a use of a compound in manufacturing such a
10 pharmaceutical composition. More specifically, this invention relates to a pharmaceutical composition for promoting the secretion of ApoE comprising a certain 4,6-di-t-butyl-dihydrobenzofuran derivative, to a method for promoting the same, and to a use of certain 4,6-di-t-butyl-
15 dihydrobenzofuran derivatives in manufacturing such a pharmaceutical composition.

BACKGROUND OF THE INVENTION

ApoE is one of the major constituents of
20 apolipoproteins contained in lipoproteins such as chylomicron, very low density lipoprotein (VLDL), and high density lipoprotein (HDL). It is a glycoprotein composed of 299 amino acid residues and some sugar moieties containing sialic acids and has a molecular weight of approximately
25 34,000. ApoE is produced in kidney, brain, macrophages and the like, and mainly in liver.

Apolipoproteins contained in lipoproteins are believed to be important to the binding of the lipoproteins to their

respective receptors. Therefore, ApoEs can bind to a variety of receptors, such as low density lipoprotein (LDL) receptor, VLDL receptor, LDL receptor-related protein, and ApoE receptor 2, which receptors are present on cell
5 surfaces throughout a living body. Hence, as a result of the interaction of ApoEs contained in chylomicrons, VLDLs and HDLs with the corresponding receptors, the lipoproteins are delivered to all the organs of a living body where the lipoproteins are decomposed into triglycerides and
10 cholesterol (hereinafter the term "cholesterol" includes both the free and ester forms of cholesterol). See, Davignon J, Cohn JS, Mabile L, Bernier L, "Apolipoprotein E and atherosclerosis: insight from animal and human studies", Clinica Chimica Acta. 286 (1-2):115-43 (1999); Rubin. E.M.
15 and Plump. A.S., p.199 in Lipoproteins in health and disease, Ed. Betteridge, D.J., Illingworth. and Shepherd. J. (1999) Arnold.

ApoEs are also known to be essential for a normal lipid metabolism of macrophages. Further, ApoEs are
20 believed to play an important role in the reverse cholesterol transport from peripheral tissues to liver. Furthermore, it is known that ApoEs produced in macrophages or hepatic cells undergo a saccharification and, consequently, most of them remain bound to the cells and are
25 not secreted. See, Schmitt M, Grand-Perret T, "Regulated turnover of a cell surface-associated pool of newly synthesized apolipoprotein E in HepG2 cells", Journal of Lipid Research. 40(1):39-49 (1999); Zhao Y, Mazzone T,

"Transport and processing of endogenously synthesized ApoE on the macrophage cell surface", Journal of Biological Chemistry, 275(7):4759-65 (2000).

Advances have been made in recent years in
5 embryological engineering and various types of transgenic mice have been developed, such as ApoE deficient mouse. A normal mouse is inherently strongly resistant to arteriosclerosis. However, an ApoE deficient mouse is known to be susceptible to type III hyperlipidemia due to the
10 deletion of a single gene coding for ApoE, which disease then spontaneously progresses to atherosclerosis characterized by the lipid accumulation in arterial wall. Atherosclerosis is characterized in that lipids are deposited on the inner walls of arteries.

15 It has been observed that introduction of ApoE-producing macrophages obtained from a wild type mouse into an ApoE deficient mouse via a bone marrow transplantation inhibits lipid deposition on inner walls of arteries of the ApoE deficient mouse. See, Linton MF, Atkinson JB, Fazio S.
20 "Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation." Science 267:1034-1037 (1995); Boisvert W.A., Spangenberg J. & Curtiss L.K., "Treatment of severe hypercholesterolemia in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation." J. Clin.
25 Invest. 96, 1118-1124 (1995); Bellosta S, Mahley RW, Sanan DA, Murata J, Newland DL, Taylor JM, Pitas RE., "Macrophage-specific expression of human apolipoprotein E reduces atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E-null mice.", J Clin Invest 96:2170-2179 (1995).

It has also been observed that transplantation of macrophages obtained from an ApoE deficient mouse to a wild type mouse promotes a lipid deposition on inner walls of arteries of the wild type mouse. See, Fazio S, Babaev V R, Murray, A B, Hasty A H, Carter K J, Gleaves L A, Atkinson J B & Linton M F, "Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 4647-4652 (1997).

These results were obtained even in the cases where no influence of the transplantation on the hyperlipidemic condition was observed, suggesting that the secretion of ApoE from macrophages is a more crucial factor than the distribution of serum lipoprotein in inhibiting lipid deposition on inner walls of arteries.

Cholesterol efflux capacity of serum which has been lost due to ApoE-deficiency may be restored by a low-dose expression of ApoE in macrophages. See, Yenhong Zhu, Stefano Bellosta, Claus Langer, Franco Bernini, Robert E. Pitas, Robert W. Mahley, Gerd Assmann, and Arnold von Eckardstein, "Low-dose expression of a human apolipoprotein E transgene in macrophages restores cholesterol efflux capacity of apolipoprotein E-deficient mouse plasma", PNAS 95: 7585-7590 (1998). ApoE-secretion from macrophages is essential for the promotion of cholesterol efflux. See, Lin CY, Duan H, Mazzone T, "Apolipoprotein E-dependent cholesterol efflux from macrophages: kinetic study and divergent mechanisms for endogenous versus exogenous apolipoprotein E", Journal of Lipid Research. 40(9):1618-27 (1999). Hence, it is believed that ApoE secreted from

macrophages plays an important role in the aforementioned inhibitory effect on lipid deposition.

Cholesterol, especially free cholesterol, not only is an important constituent of plasma membrane but also plays an important role as a constituent of organelle membrane in cells. However, due to the interference with cell functions made by the presence of excess free cholesterol, the excess free cholesterol is esterified by acyl CoA-cholesterol acyltransferase and then stored as cholesteryl ester in the cells. In the case where cells are macrophages, they accumulate large excesses of cholesteryl ester therein due to the expression of scavenger receptors by the macrophages which is not regulated by sterol regulatory element binding proteins, and such macrophages then become foam cells. The accumulated cholesteryl is hydrolyzed into free cholesterol by neutral cholesterol esterase, as necessary.

It is believed that cholesterol excreted from cells by ApoE is mainly free cholesterol present on the cell membrane. Cellular cholesteryl ester is hydrolyzed into free cholesterol to keep the level of free cholesterol on the cell membrane constant. As a result, the cholesterol content of the cells decreases.

It was believed that acute myocardial infarction is caused by a stenosis of responsible coronary artery. However, recent studies revealed that the proportion of the cases where significant organic stenosis is observed in infract-related coronary artery before the onset of acute myocardial infarction is less than 15 percent, and, in many

cases, the cause of acute myocardial infarction is an obstruction in coronary artery resulting from thrombi which have been formed via a disruption of atherosclerotic plaques. It was also revealed that an unstable angina is the case
5 where thrombi formed by the disruption of plaques are transient and do not bring about a myocardial infarction.

A series of diseases caused by the thrombotic obstruction of coronary artery resulting from the disruption of atherosclerotic plaques is collectively called acute
10 coronary syndrome (ACS). See, Davies M J., "Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis", Circulation., 94:2013-2020 (1996); Libby P, "The molecular bases of the acute coronary syndromes", Circulation., 91:2844-2850 (1995); Falk E, Shah P, Fuster V, "Coronary
15 plaque disruption", Circulation., 92:657671 (1995). In view of the cause of ACS, ACS can undoubtedly be inhibited by making it hard to disrupt the atherosclerotic plaques.

It has become evident that the liability of atherosclerotic plaques to be disrupted depends on their
20 composition rather than their size or degree of clustering in coronary artery. One of the most significant features of atherosclerotic plaques which make them liable to be disrupted is that the plaques have lipid-rich cores which are composed of macrophage-derived foam cells and therefore
25 contain a large amount of cholesteryl ester. See, Libby P, Clinton SK., "The role of macrophages in atherogenesis", Curr Opin Lipidol., 4:355-363 (1993). Thus, the removal of cholesteryl ester from the lipid-rich cores or the foam

cells will make it hard to disrupt atherosclerotic plaques.

In the lipid-rich cores, it is also observed that lipids, especially cholesterol, are accumulated in intercellular space of the foam cells. The lipids thus accumulated are

5 normally taken up by macrophages. Accordingly, the removal of such cholesterol taken up by macrophages will promote the removal of cholesterol deposited in intercellular space, thereby allowing an efficient removal of lipids from lipid-rich cores.

10 Recently, it has been shown that a reduction in the lipid content of lipid-rich cores results in stabilized atherosclerotic plaques which are hard to disrupt. Aikawa M et al showed that atherosclerotic plaques in an animal were stabilized and made hard to disrupt by giving to the animal
15 a diet containing a lowered content of lipids. See, Aikawa M, Rabkin E, Okada Y, Voglic SJ, Clinton SK, Brinckerhoff CE, Sukhova GK, Libby P, "Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: a potential mechanism of lesion
20 stabilization. Circulation", 97(24):2433-44 (1998). Further, Crisby et al showed that a significant decrease in serum cholesterol was achieved by administering antihyperlipidemic agent, HMG-CoA reductase inhibitor, thereby atherosclerotic plaques being stabilized and made hard to disrupt. See,
25 Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah P. K., Yano J., Zhu J., Nilsson J.(2001), "Pravastatin Treatment Increases Collagen Content and Decreases Lipid Content, Inflammation, Metalloproteinases, and Cell Death in Human Carotid

Plaques": "Implications for Plaque Stabilization",

Circulation 103: 926-933; Fukumoto Y., Libby P., Rabkin E.,

Hill C. C., Enomoto M., Hirouchi Y., Shiomi M., Aikawa M,

"Statins Alter Smooth Muscle Cell Accumulation and Collagen

5 Content in Established Atheroma of Watanabe Heritable

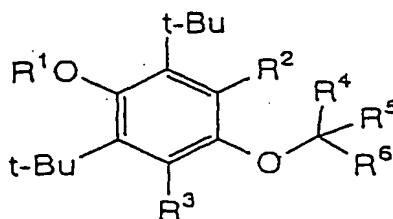
Hyperlipidemic Rabbits". Circulation 103: 993-999 (2001).

Accordingly, if the secretion of ApoE is promoted,
whereby the cholesterol efflux capacity of serum is promoted,
and if the efflux capacity thus promoted contributes to the
10 removal of cholesterol from atherosclerotic plaques, i.e.,
to the stabilization of the plaques, it will become possible
to prevent and treat ACS such as acute myocardial infarction
and unstable angina.

15 PRIOR ART

Liver X receptor (LXR) has been reported to have a
capability of promoting the secretion of ApoE. However, it
has not yet been clinically used. Therefore, there exists a
need in the art for a further drug which has an activity
20 increasing a topical or blood ApoE level.

The compounds represented by the formula:



are disclosed in JP 6-206842A, the corresponding US Patent No.5,574,178, and the corresponding European Patent No.0665208B, as having an antioxidant activity.

5 The same compounds are also disclosed in JP 11-21238A, the corresponding US Patent No.6,156,793, and the corresponding European Patent Appln. No.98917638.3, as active ingredients of a pharmaceutical composition for preventing and treating arteriosclerosis.

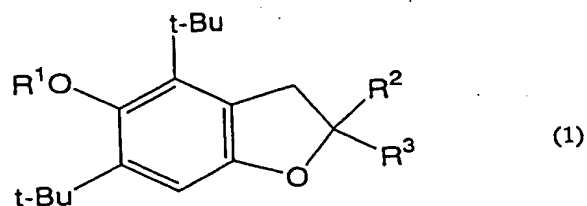
10 However, these publications and patents do not disclose that the compounds have an activity promoting secretion of ApoE or decreasing intracellular lipid content, especially intracellular cholesterol content, via the promoted secretion of ApoE.

15 DISCLOSURE OF THE INVENTION

The present invention provides a pharmaceutical composition which can remove intracellular lipids via the promoted secretion of ApoE.

20 We found that certain 4,6-di-t-butyl-dihydrobenzofuran derivatives promote the secretion of ApoE in cells so that a blood ApoE level or topical ApoE level in an organ is increased, whereby an intracellular lipid content, especially intracellular cholesterol content, is decreased.

25 Therefore, the present invention provides a pharmaceutical composition for promoting the secretion of ApoE, comprising a compound represented by formula (1):



wherein

R¹ represents hydrogen atom, an acyl group or an arylalkoxycarbonyl group, and

5 R² and R³ are each independently a substituted or unsubstituted alkyl group, a substituted or unsubstituted alkenyl group, or a substituted or unsubstituted alkynyl group, or R² and R³ may combine to form a cycloalkyl group.

In one embodiment, the present invention provides a
10 pharmaceutical composition for increasing a blood ApoE level or topical ApoE level in an organ, whereby an intracellular lipid content is decreased.

In a preferred embodiment, the intracellular lipid is present in atherosclerotic plaques, and more preferably the
15 intracellular lipid is cholesterol present in atherosclerotic plaques.

In a more preferred embodiment, the present invention provides a pharmaceutical composition for removing intracellular cholesterol from atherosclerotic plaques to
20 stabilize atherosclerotic plaques, i.e., to prevent the disruption of atherosclerotic plaques, whereby the risk of acute coronary syndrome such as acute myocardial infarction or unstable angina is reduced or the severity of the disease is alleviated.

The present invention also provides a pharmaceutical composition for reducing the risk of acute coronary syndrome or alleviating the severity of the disease, comprising a compound represented by formula (1).

5 Further, the present invention provides a pharmaceutical composition for lowering intracellular lipid content, comprising a compound represented by formula (1).

Furthermore, the present invention provides a method for promoting the secretion of ApoE, comprising
10 administering an promoting-effective amount of a compound represented by formula (1) to a patient in need of such promotion.

The present invention also provides a method for reducing the risk of acute coronary syndrome such as acute
15 myocardial infarction or unstable angina or alleviating the severity of the disease, comprising administering a therapeutically effective amount of a compound represented by formula (1) to a patient in need of such treatment.

Further, the present invention provides a method for
20 lowering intracellular lipid content, comprising administering a therapeutically effective amount of a compound represented by formula (1) to a patient in need of such treatment.

Furthermore, the present invention provides a use of a
25 compound represented by formula (1) in manufacturing the foregoing pharmaceutical composition.

BRIEF DESCRIPTION OF the DRAWING

Fig. 1 shows a Western Blotting of the supernatants of foamed C57BL/6J mouse-derived macrophages untreated or treated with BO-653 and ApoE deficient mouse-derived
5 macrophages untreated with BO-653, obtained by using anti-mouse ApoE antibody.

Fig. 2 shows a SDS-PAGE of lipoprotein-containing fractions prepared from serums taken from individual mice which have been fed a high-fat diet with or without 0.65%
10 BO-653. The lipoprotein-containing fractions were loaded on the gel in such a manner that each lane has lipoprotein whose amount corresponds to that contained in 12.5 μ L of serum.

15 MOST PREFERRED EMBODIMENTS OF THE INVENTION

R^1 in the compounds of the present invention of formula (1) is hydrogen atom, an acyl group or an arylalkoxycarbonyl group. Preferred acyl groups are those having 1 to 10 carbon atoms, and examples include formyl,
20 acetyl, propionyl and benzoyl groups. Preferred arylalkoxycarbonyl groups are those having 7 to 11 carbon atoms, and examples include benzyloxycarbonyl and naphthylmethoxycarbonyl groups.

R^1 is preferably hydrogen atom or an acyl group, more
25 preferably hydrogen atom or acetyl group, especially hydrogen atom.

R^2 and R^3 in the compounds of formula (1) are each independently a substituted or unsubstituted alkyl group, a

substituted or unsubstituted alkenyl group, or a substituted or unsubstituted alkynyl group.

Preferred alkyl groups are straight or branched alkyl groups having 1 to 20 carbon atoms, and examples include
5 methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, s-butyl, t-butyl, n-pentyl, isopentyl, sec-pentyl, t-pentyl, neopentyl, n-hexyl, isohexyl, ethylbutyl, n-heptyl, isohexyl, ethylpentyl, n-octyl, ethylhexyl, propylpentyl, nonyl, decyl, pentadecyl and stearyl groups. More preferred
10 alkyl groups are straight or branched alkyl groups having 1 to 10 carbon atoms, especially straight alkyl groups having 3 to 8 carbon atoms.

Preferred alkenyl groups are straight or branched alkyl groups having 2 to 20 carbon atoms, and examples
15 include ethenyl, propenyl, isopropenyl, butenyl, isobutenyl, pentenyl, isopentenyl, hexenyl, isohexenyl, ethylbutenyl, heptenyl, isoheptenyl, ethylpentenyl, octenyl, nonenyl, decenyl and pentadecenyl groups. More preferred alkenyl groups are straight or branched alkenyl groups having 2 to
20 10 carbon atoms, especially straight alkenyl groups having 3 to 8 carbon atoms.

Preferred alkynyl groups are straight or branched alkynyl groups having 2 to 20 carbon atoms, preferably 2 to 10 carbon atoms, especially straight alkynyl groups having 3
25 to 8 carbon atoms. The examples of alkynyl groups include those corresponding to the examples of alkenyl groups.

R^2 and R^3 may combine to form a cycloalkyl group having 5 to 10 carbon atoms. Preferred examples of

cycloalkyl group are cyclopentyl, cyclohexyl, cycloheptyl, cyclooctyl, cyclononyl and cyclodecyl groups.

When R^2 and R^3 are each alkyl, alkenyl or alkynyl group, they may have one or more substituents, and examples
5 include a halogen, a lower alkoxy, hydroxy, amino, nitro and trifluoromethyl groups.

Preferred examples of R^2 and R^3 are straight and unsubstituted alkyl groups having 3 to 8 carbon atoms, and most preferably both R^2 and R^3 are n-pentyl group.

10 Preferred compounds of formula (1) are as follows:

4,6-di-t-butyl-5-hydroxy-2,2-dimethyl-2,3-dihydrobenzofuran;

4,6-di-t-butyl-5-hydroxy-2,2-diethyl-2,3-dihydrobenzofuran;

15 4,6-di-t-butyl-5-hydroxy-2,2-di-n-propyl-2,3-dihydrobenzofuran;

4,6-di-t-butyl-5-hydroxy-2,2-di-isopropyl-2,3-dihydrobenzofuran;

20 4,6-di-t-butyl-5-hydroxy-2,2-di-n-butyl-2,3-dihydrobenzofuran;

4,6-di-t-butyl-5-hydroxy-2,2-di-s-butyl-2,3-dihydrobenzofuran;

4,6-di-t-butyl-5-hydroxy-2,2-di-t-butyl-2,3-dihydrobenzofuran;

25 4,6-di-t-butyl-5-hydroxy-2,2-di-n-pentyl-2,3-dihydrobenzofuran;

4,6-di-t-butyl-5-hydroxy-2,2-di-t-pentyl-2,3-dihydrobenzofuran;

4,6-di-t-butyl-5-hydroxy-2,2-di-isopentyl-2,3-dihydrobenzofuran;

4,6-di-t-butyl-5-hydroxy-2,2-di-neopentyl-2,3-dihydrobenzofuran;

5 4,6-di-t-butyl-5-hydroxy-2,2-di-n-hexyl-2,3-dihydrobenzofuran;

4,6-di-t-butyl-5-hydroxy-2,2-di-n-heptyl-2,3-dihydrobenzofuran;

10 4,6-di-t-butyl-5-hydroxy-2,2-di-n-octyl-2,3-dihydrobenzofuran;

4,6-di-t-butyl-5-hydroxy-2,2-di-n-nonyl-2,3-dihydrobenzofuran; and

4,6-di-t-butyl-5-hydroxy-2,2-di-n-decyl-2,3-dihydrobenzofuran.

15 Especially preferable compound of formula (1) is 4,6-di-t-butyl-5-hydroxy-2,2-di-n-pentyl-2,3-dihydrobenzofuran.

The compounds of formula (1) used in the present invention can be synthesized according to the procedures described in JP 6-206842A, the corresponding US Patent
20 No.5,574,178, or the corresponding European Patent No.0665208B, for example.

In the present invention, the examples of organs where an ApoE level is topically increased include intima and, in particular, those in which numerous macrophages are located.
25 A blood ApoE level can be determined according to an immunological method in which an anti-ApoE antibody is used. On the other hand, a topical ApoE level in an organ can be determined according to such an immunological method or a

molecular biological method such as FISH method in which an ApoE-gene or a fragment thereof is used.

The term "intracellular lipids" as used herein refers to phospholipids, triglycerides, cholesteryl esters, and
5 free cholesterol. In particular, cholesteryl esters and free cholesterol represent main intracellular lipids. The examples of cells in which these lipids are accumulated typically include vascular smooth muscle cells and, in particular, macrophages. The term "removal of intracellular
10 lipids" refers to the event in which intracellular lipids or cell membrane lipids are removed from the cells via the formation of a nascent lipoprotein by the action of ApoE on the lipids.

The term "atherosclerotic plaques" as used herein
15 refers to a vascular lesion formed by a fibrous capsule composed of macrophage-derived foam cells and smooth muscle cells which covers lipid-rich cores.

The term "disruption of atherosclerotic plaques" means that the fibrous capsule composed of smooth muscle cells
20 which covers the lipid-rich cores is disrupted. Due to the disruption, tissue factors expressed in the foam cells and located on their surface are exposed to flowing-blood and then formed into thrombi. When the formation of thrombi occurs in coronary artery, they may cause the onset of acute
25 myocardial infarction or unstable angina.

The term "stabilization of atherosclerotic plaques" as used herein means that the atherosclerotic plaques become

hard to disrupt by reducing the lipid content of lipid-rich cores.

The pharmaceutical composition of the present invention may be formulated in various dosage forms depending on the route of administration, by combining a compound represented by formula (1) which is an active ingredient with physiologically acceptable solid or liquid pharmaceutical carriers. The examples of the route of administration include oral route and parenteral routes such as intravenous injection. Further, the composition may be administered as a sustained-release formulation, or topically by means of a catheter. The examples of the pharmaceutical carriers include those commonly used, such as excipients, binders, disintegrants, lubricants, coating agents, dissolution-aids, emulsifiers, suspending agents, stabilizers, fats and oils, and solvents. The examples of the dosage forms include tablets, granules, pills, capsules, solutions, syrups, suspensions, emulsions and injections.

The actual dosage of the compound represented by formula (1) of the present invention will be determined depending on the age of the patient, the severity of the condition to be treated, the route of administration, and the like. However, the dosage will normally fall within 1 - 1000 mg, preferably 50 - 400 mg per day in the treatment of adult human, and can be taken all at once or divided up several times.

The following examples are provided herein for purposes of illustration only, and are not intended to limit the scope of the present invention.

5 EXAMPLES

Test example 1: ApoE secretion-promoting and intracellular cholesterol-removing effects

4.05 w/v% thioglycollate-elicited intraperitoneally exuded cells were prepared from C57BL/6J and ApoE-deficient mice. The cells were inoculated on 12-well plate at 1.0×10^6 cells/well. The cells were cultured at 37°C under 5 vol% CO₂. After 3 hours of culture, the culture medium was changed to a fresh one to remove inadhesive cells, leaving mouse-peritoneal macrophages in each of the wells. Next day, the mouse-peritoneal macrophages were cultured in a medium containing 50 µg of protein per mL of acetylated LDL for 24 hours to form foam cells.

To the wells containing the foamed C57BL/6J mouse-derived macrophages, 4,6-di-t-butyl-2,2-dipentyl-5-hydroxy-2,3-dihydrobenzofuran (BO-653) was added to final concentrations of 0, 3 and 10 µmol/L. After 24 hours of culture, the supernatants were collected to prepare samples for SDS-PAGE.

The samples were subjected to 10 w/v% SDS-PAGE. Following the SDS-PAGE, the bands were transferred onto nitrocellulose papers using semi-drying method and blocked with TBS containing 10 w/v% skim milk and 0.1 vol% Tween-20. Rabbit anti-mouse ApoE-antibody (#K23100R, BIODSIGN) and

peroxidase-labeled anti-rabbit IgG antibody (#7071-1, Cell Signaling TECHNOLOGY) were used as the first and secondary antibodies, respectively. ApoE was detected using chemoluminescence method (PIERCE). The results are shown in
5 Fig. 1.

As can be seen from Fig. 1, the increased saccharified-ApoE expression was observed in the cultures to which BO-653 was added. In contrast, no saccharified-ApoE was observed in the cultures of macrophages derived from
10 ApoE-deficient mouse.

On the other hand, the foamed macrophages which were cultured in the presence of BO-653 and harvested at the same time as the collection of the supernatants were extracted with a mixed solvent of hexane/2-propanol (3:2 v/v) to
15 obtain lipids. Then, the total amount of cholesterol in the lipids was measured using the enzymatic method described by Yoshiki Kawabe et al., "Oxidation-Induced Aggregation of Rabbit Low-Density Lipoprotein by Azo Initiator", Achieves of Biochemistry and Biophysics 310, 489-496 (1994). We
20 regarded the total amount of cholesterol as intracellular cholesterol content of the macrophages. Table 1 shows percent reduction in intracellular cholesterol content of BO-653-treated macrophages relative to the vehicle used for culturing the macrophages. The data demonstrate a decrease
25 in intracellular cholesterol content due to the treatment with BO-653.

Table 1: Reduction in Intracellular
Cholesterol Content

BO-653 ($\mu\text{mol/L}$)	Cholesterol Reduction (%)	
	Means	S.D.
0	100.0	6.9
3	132.6	23.1
10	145.9	28.1

Test example 2: ApoE increasing effect in mouse serum

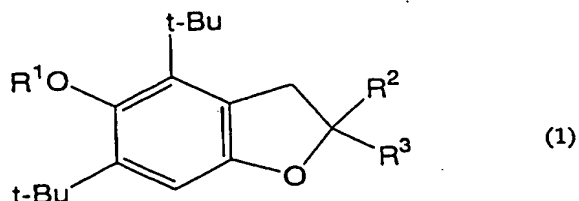
5 Seven-week-old C57BL/6J mice were divided into first
group of three and second group of four. The animals of the
first and second groups were fed a high fat diet containing
no BO-653 and 0.65% BO-653, respectively. After 5 weeks of
diet initiation, the animals were anesthetized with ether
10 and their blood was individually drawn from vena cava
descendens. Serum samples were prepared from the drawn
blood and 100 μL of each of the samples was placed into a
tube. To the tube, 900 μL of sodium bromide solution having
1.256 density was added, and the tube was centrifuged in TL-
15 100 desk type ultracentrifuge at 100,000 rpm for 20 hours
using TLA-100.2 rotor. Lipoprotein-containing fraction thus
obtained was collected and treated with 10 w/v%
trichloroacetic acid solution. The precipitate was
collected and dissolved into 80 μL of solution for SDS-PAGE.
20 10 μL of the solution was subjected to 15 w/v% SDS-PAGE and
the gels were stained with Coomassie brilliant blue. By
comparing the bands with molecular weight markers, ApoE was
identified. The results are shown in Fig. 2.

As can be seen from Fig. 2, an increased ApoE production was observed in the animals of the second group relative to the first group.

As described previously, the compounds of formula (1) are disclosed in JP 11-21238A and in the corresponding patents issued in other countries as an active ingredient of a pharmaceutical composition for preventing and treating arteriosclerosis. However, in those patents, the compounds of formula (1) are described as inhibitors of the formation of arteriosclerotic lesions which inhibits the formation in a direct manner, as can be seen from the descriptions of their Test Examples. In contrast, according to the present invention, the compounds of formula (1) act via the following mechanism: promotion of the secretion of ApoE, removal of free cholesterol, and then amelioration of peripheral diseases. As a result, it can be expected that non-arteriosclerotic diseases such as acute myocardial infarction and unstable angina will be suppressed with the compounds. Therefore, the pharmaceutical activity of the compounds of formula (1) found by the present inventors is remarkably different from that disclosed in the above patents.

CLAIMS

1. A pharmaceutical composition for promoting the secretion of apolipoprotein E, comprising a compound
5 represented by formula (1):



wherein

- R^1 represents hydrogen atom, an acyl group or an
10 arylalkoxycarbonyl group, and

- R^2 and R^3 are each independently a substituted or unsubstituted alkyl group, a substituted or unsubstituted alkenyl group, or a substituted or unsubstituted alkynyl group, or R^2 and R^3 may combine to form a cycloalkyl group.
- 15 2. The composition of Claim 1, wherein said secretion of apolipoprotein E increases a blood apolipoprotein E level or a topical apolipoprotein E level in an organ.

3. The composition of Claim 1, wherein intracellular lipids are removed via the increase in an apolipoprotein E
20 level.

4. The composition of Claim 3, wherein said intracellular lipids are present in atherosclerotic plaques.

5. The composition of Claim 4, wherein said removal of intracellular lipids results in stabilization of

atherosclerotic plaques for the prevention of the disruption of atherosclerotic plaques.

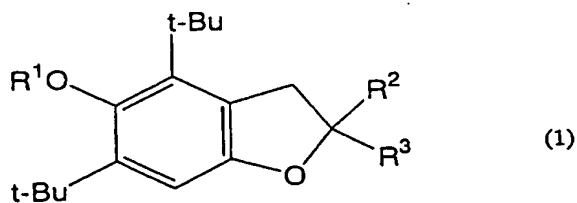
6. The composition of Claim 3, wherein said intracellular lipids are free cholesterol or cholesteryl esters.

7. The composition of Claim 5, wherein said prevention of the disruption of atherosclerotic plaques reduces the risk of or alleviates the severity of acute coronary syndrome.

8. The composition of Claim 7, wherein said acute coronary syndrome is acute myocardial infarction or unstable angina.

9. The composition of Claim 1, wherein said compound represented by formula (1) is 4,6-di-t-butyl-5-hydroxy-2,2-di-n-pentyl-2,3-dihydrobenzofuran.

10. A pharmaceutical composition for reducing the risk of or alleviating the severity of acute coronary syndrome, comprising a compound represented by formula (1):



wherein

R¹ represents hydrogen atom, an acyl group or an arylalkoxycarbonyl group, and

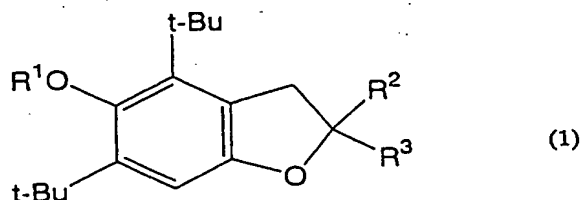
R² and R³ are each independently a substituted or unsubstituted alkyl group, a substituted or unsubstituted

alkenyl group, or a substituted or unsubstituted alkynyl group, or R² and R³ may combine to form a cycloalkyl group.

11. The composition of Claim 10, wherein said acute coronary syndrome is acute myocardial infarction or unstable
5 angina.

12. The composition of Claim 10, wherein said compound represented by formula (1) is 4,6-di-t-butyl-5-hydroxy-2,2-di-n-pentyl-2,3-dihydrobenzofuran.

13. A pharmaceutical composition for decreasing an
10 intracellular lipid content, comprising a compound represented by formula (1):



wherein

15 R¹ represents hydrogen atom, an acyl group or an arylalkoxycarbonyl group, and

R² and R³ are each independently a substituted or unsubstituted alkyl group, a substituted or unsubstituted alkenyl group, or a substituted or unsubstituted alkynyl
20 group, or R² and R³ may combine to form a cycloalkyl group.

14. The composition of Claim 13, wherein said intracellular lipids are present in atherosclerotic plaques.

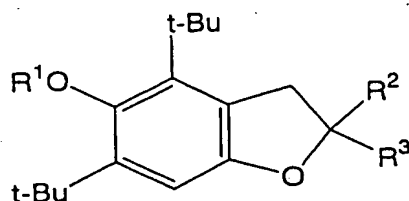
15. The composition of Claim 13, wherein said intracellular lipids are free cholesterol or cholesteryl
25 esters.

16. The composition of Claim 13, wherein said decrease in intracellular lipid content results in prevention of the disruption of atherosclerotic plaques.

17. The composition of Claim 16, wherein said prevention of the disruption of atherosclerotic plaques reduces the risk of or alleviates the severity of acute coronary syndrome.

18. The composition of Claim 13, wherein said compound represented by formula (1) is 4,6-di-t-butyl-5-hydroxy-2,2-di-n-pentyl-2,3-dihydrobenzofuran.

19. A method for promoting the secretion of apolipoprotein E in a patient in need thereof which comprises administering to the patient an promoting effective amount of a compound represented by formula (1):



(1)

wherein

R¹ represents hydrogen atom, an acyl group or an arylalkoxycarbonyl group, and

R² and R³ are each independently a substituted or unsubstituted alkyl group, a substituted or unsubstituted alkenyl group, or a substituted or unsubstituted alkynyl group, or R² and R³ may combine to form a cycloalkyl group.

20. The method of Claim 19, wherein said secretion of apolipoprotein E increases a blood apolipoprotein E level or a topical apolipoprotein E level in an organ.

21. The method of Claim 20, wherein intracellular
5 lipids are removed via the increase in a level of apolipoprotein E.

22. The method of Claim 21, wherein said intracellular lipids are present in atherosclerotic plaques.

23. The method of Claim 22, wherein said removal of
10 intracellular lipids results in stabilization of atherosclerotic plaques for the prevention of the disruption of atherosclerotic plaques.

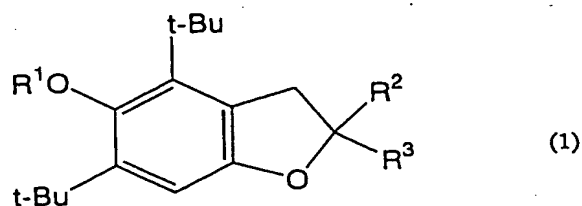
24. The method of Claim 21, wherein said intracellular lipids are free cholesterol or cholesteryl esters.

15 25. The method of Claim 23, wherein said prevention of the disruption of atherosclerotic plaques reduces the risk of or alleviates the severity of acute coronary syndrome.

26. The method of Claim 25, wherein said acute coronary syndrome is acute myocardial infarction or unstable
20 angina.

27. The method of Claim 19, wherein said compound represented by formula (1) is 4,6-di-t-butyl-5-hydroxy-2,2-di-n-pentyl-2,3-dihydrobenzofuran.

28. A method for reducing the risk of or alleviating
25 the severity of acute coronary syndrome in a patient in need thereof which comprises administering to the patient a therapeutically effective amount of a compound represented by formula (1):



wherein

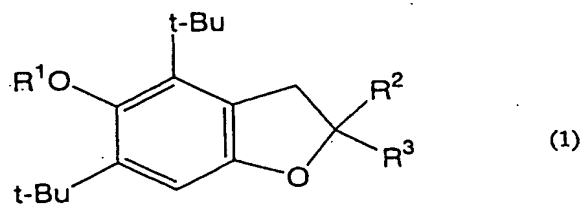
R¹ represents hydrogen atom, an acyl group or an arylalkoxycarbonyl group, and

5 R² and R³ are each independently a substituted or unsubstituted alkyl group, a substituted or unsubstituted alkenyl group, or a substituted or unsubstituted alkynyl group, or R² and R³ may combine to form a cycloalkyl group.

29. The method of Claim 28, wherein said acute
10 coronary syndrome is acute myocardial infarction or unstable angina.

30. The method of Claim 28, wherein said compound represented by formula (1) is 4,6-di-t-butyl-5-hydroxy-2,2-di-n-pentyl-2,3-dihydrobenzofuran.

15 31. A method for decreasing an intracellular lipid content in a patient in need thereof which comprises administering to the patient a therapeutically effective amount of a compound represented by formula (1):



20 wherein

R¹ represents hydrogen atom, an acyl group or an arylalkoxycarbonyl group, and

R² and R³ are each independently a substituted or unsubstituted alkyl group, a substituted or unsubstituted alkenyl group, or a substituted or unsubstituted alkynyl group, or R² and R³ may combine to form a cycloalkyl group.

32. The method of Claim 31, wherein said intracellular lipids are present in atherosclerotic plaques.

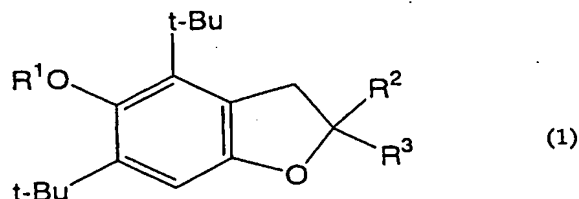
33. The method of Claim 31, wherein said intracellular lipids are free cholesterol or cholesteryl esters.

34. The method of Claim 31, wherein said decrease in intracellular lipids results in prevention of the disruption of atherosclerotic plaques.

35. The method of Claim 34, wherein said prevention of the disruption of atherosclerotic plaques reduces the risk of or alleviates the severity of acute coronary syndrome.

36. The method of Claim 31, wherein said compound represented by formula (1) is 4,6-di-t-butyl-5-hydroxy-2,2-di-n-pentyl-2,3-dihydrobenzofuran.

37. Use of a compound represented by formula (1):



wherein

R¹ represents hydrogen atom, an acyl group or an arylalkoxycarbonyl group, and

R² and R³ are each independently a substituted or unsubstituted alkyl group, a substituted or unsubstituted alkenyl group, or a substituted or unsubstituted alkynyl group, or R² and R³ may combine to form a cycloalkyl group,
5 in manufacturing a pharmaceutical composition for promoting the secretion of apolipoprotein E.

38. The use of Claim 37, wherein said secretion of apolipoprotein E increases a blood apolipoprotein E level or a topical apolipoprotein E level in an organ.

10 39. The use of Claim 38, wherein intracellular lipids are removed via the increase in a level of apolipoprotein E.

40. The use of Claim 39, wherein said intracellular lipids are present in atherosclerotic plaques.

15 41. The use of Claim 40, wherein said removal of intracellular lipids results in stabilization of atherosclerotic plaques for the prevention of the disruption of atherosclerotic plaques.

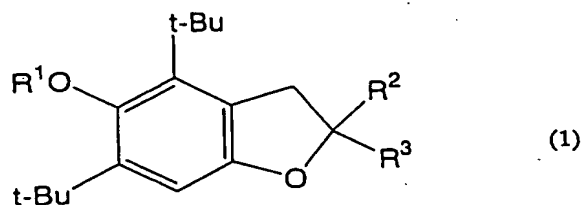
42. The use of Claim 39, wherein said intracellular lipids are free cholesterol or cholesteryl esters.

20 43. The use of Claim 41, wherein said prevention of the disruption of atherosclerotic plaques reduces the risk of or alleviates the severity of acute coronary syndrome.

44. The use of Claim 43, wherein said acute coronary syndrome is acute myocardial infarction or unstable angina.

25 45. The use of Claim 37, wherein said compound represented by formula (1) is 4,6-di-t-butyl-5-hydroxy-2,2-di-n-pentyl-2,3-dihydrobenzofuran.

46. Use of a compound represented by formula (1):



wherein

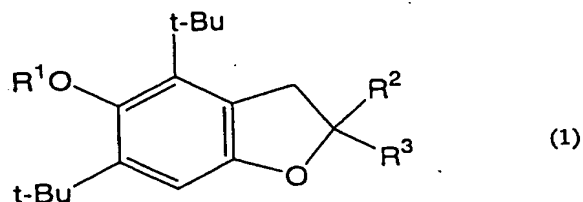
R¹ represents hydrogen atom, an acyl group or an arylalkoxycarbonyl group, and

5 R² and R³ are each independently a substituted or unsubstituted alkyl group, a substituted or unsubstituted alkenyl group, or a substituted or unsubstituted alkynyl group, or R² and R³ may combine to form a cycloalkyl group, in manufacturing a pharmaceutical composition for reducing
10 the risk of or alleviating the severity of acute coronary syndrome.

47. The use of Claim 46, wherein said acute coronary syndrome is acute myocardial infarction or unstable angina.

48. The use of Claim 46, wherein said compound
15 represented by formula (1) is 4,6-di-t-butyl-5-hydroxy-2,2-di-n-pentyl-2,3-dihydrobenzofuran.

49. Use of a compound represented by formula (1):



20 wherein

R¹ represents hydrogen atom, an acyl group or an arylalkoxycarbonyl group, and

R² and R³ are each independently a substituted or unsubstituted alkyl group, a substituted or unsubstituted alkenyl group, or a substituted or unsubstituted alkynyl group, or R² and R³ may combine to form a cycloalkyl group,
5 in manufacturing a pharmaceutical composition for decreasing an intracellular lipid content.

50. The use of Claim 49, wherein said intracellular lipids are present in atherosclerotic plaques.

51. The use of Claim 49, wherein said intracellular
10 lipids are free cholesterol or cholesteryl esters.

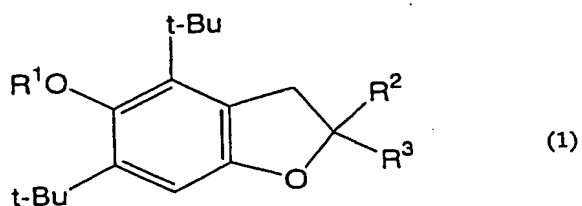
52. The use of Claim 49, wherein said decrease in intracellular lipid content results in prevention of the disruption of atherosclerotic plaques.

53. The use of Claim 52, wherein said prevention of
15 the disruption of atherosclerotic plaques reduces the risk of or alleviates the severity of acute coronary syndrome.

54. The use of Claim 49, wherein said compound represented by formula (1) is 4,6-di-t-butyl-5-hydroxy-2,2-di-n-pentyl-2,3-dihydrobenzofuran.

ABSTRACT

A pharmaceutical composition comprising a compound represented by the following formula:



which promote the secretion of ApoE, lower the onset frequency of acute coronary syndrome or relieve the symptom thereof, and lower intracellular lipid content; and a method
10 therefor are provided. Moreover, a use of a compound of formula (1) in manufacturing the above pharmaceutical composition is also provided.

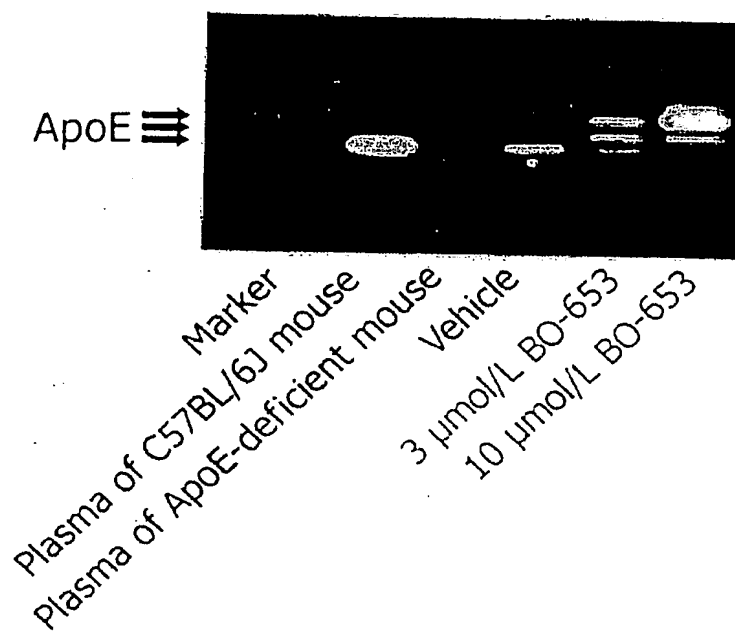


Fig. 1.

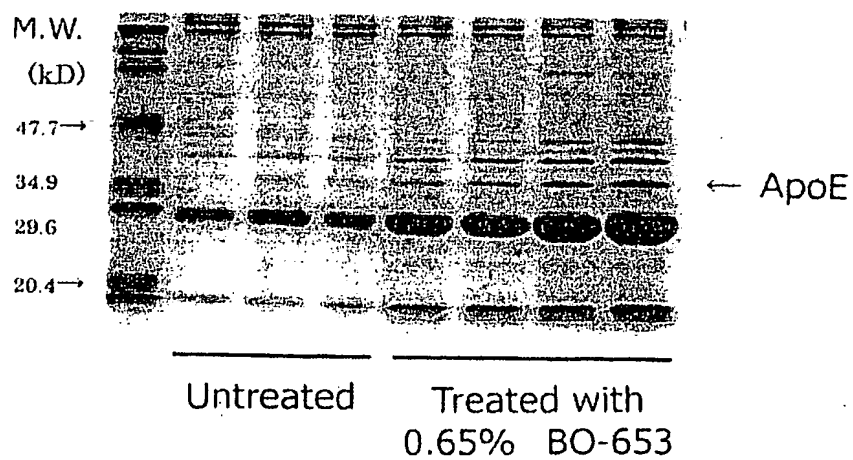
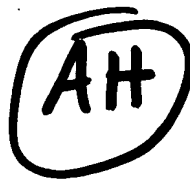


Fig. 2.



(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 3 月 6 日 (06.03.2003)

PCT

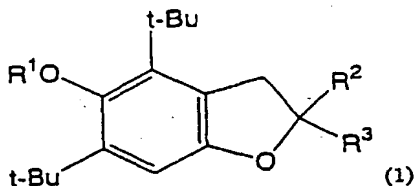
(10) 国際公開番号
WO 03/018001 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 31/343, (72) 発明者; および
A61P 3/06, 9/10, 43/00, C07D 307/79 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 横山 信治
(YOKOYAMA, Shinji) [JP/JP]; 〒467-0024 愛知県 名古屋 市 瑞穂区 春山町 6-11-102 Aichi (JP).
(21) 国際出願番号: PCT/JP02/08807 金明俊 (KIM, Myungjoon) [KR/JP]; 〒412-8513 静岡県 御殿場市 駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 川邊 良樹 (KAWABE, Yoshiki) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県 御殿場市 駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 進士修 (CYNISHI, Osamu) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県 御殿場市 駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).
(22) 国際出願日: 2002 年 8 月 30 日 (30.08.2002)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ: 特願2001-263547 2001 年 8 月 31 日 (31.08.2001) JP
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都 北区 浮間 5 丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP). (74) 代理人: 社本 一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都 千代田区 大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 206 区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: APOLIPO PROTEIN E SECRETION PROMOTERS

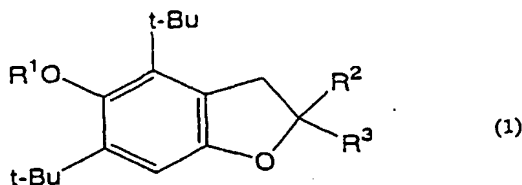
(54) 発明の名称: アポリポタンパク質Eの分泌促進剤



(57) Abstract: Medicinal compositions containing compounds represented by the following general formula (1) which promote the secretion of apo E, lower the onset frequency of acute circulatory syndrome or relieve the symptom thereof, and lower intracellular lipid content; and a method thereof: (1) Moreover, use of the compounds of the formula (1) in producing the above medicinal compositions is provided.

(57) 要約:

本発明は、式 (1) :



で表される化合物を含んでなる、アポEの分泌を促進し、急性冠症候群の発生頻度を低減または症状を軽減し、そして細胞内脂質含量を低下させるための医薬組成物および方法を提供する。本発明は、そのような医薬組成物の製造における式 (1) で表される化合物の使用も提供する。



(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ

特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

アポリポタンパク質Eの分泌促進剤

技術分野

- 5 本発明は、アポリポタンパク質E（以下、アポEと略記する）の分泌を促進するための医薬組成物および方法、ならびにそのような医薬組成物の製造における化合物の使用に関する。より具体的には、一定の4,6-ジ- α -ブチルジヒドロベンゾフラン誘導体を含んでなる、アポEの分泌を促進するための医薬組成物および方法、ならびにそのような医薬組成物の製造における一定の4,6-ジ- α -ブチルジヒドロベンゾフラン誘導体に関する。
- 10

背景技術

- アポEは、カイロミクロン、超低比重リポタンパク質（VLDL）および高比重リポタンパク質（HDL）のようなりポタンパク質が有する主要なアポリポタンパク質成分の一つであり、299のアミノ酸残基とシアル酸を含む糖鎖とからなる約34,000の分子量を有する糖タンパク質である。その発現は、主に肝臓で行なわれるが、腎臓、脳およびマクロファージなどでも行なわれる。
- 15

- リポタンパク質に含まれるアポリポタンパク質は、各種受容体との結合に重要と考えられており、アポEも生体内の至るところで細胞表面に存在する低比重リポタンパク質（LDL）受容体、VLDL受容体、LDL受容体関連タンパク質、およびアポE受容体2のような種々の受容体に結合する。このため、アポEを含有するカイロミクロン、VLDLおよびHDLは、このアポEとこれら受容体との相互作用の結果として全身の臓器に運搬され、そこでその成分であるトリグリセリドやコレステロール（以下、単にコレステロールというときは、遊離コレステロールおよびコレステロールエステルの両方を包含するものとする）のような脂質に分解されることになる（Davignon J, Cohn JS, Mabile L, Bernier L, "Apolipoprotein E and atherosclerosis: insight from animal and human studies", Clinica Chimica Acta. 286 (1-2):115-43 (1999); Rubin. E.M. and Plump. A.S., p.199 in Lipoproteins in health and disease, Ed. Betteridge,
- 20
- 25

D.J., Illingworth. and Shepherd. J. (1999) Arnold)。

アポEは、マクロファージにおいても正常な脂質代謝に必須であることが知られている。また、アポEは、末梢組織から肝臓へのコレステロール逆転送に重要な役割を果たすとされる。マクロファージあるいは肝細胞で産生されたアポEは
5 糖化を受けることが知られており、従ってそのほとんどが分泌されずに細胞に結合して存在していると考えられている (Schmitt M, Grand-Perret T, "Regulated turnover of a cell surface-associated pool of newly synthesized apolipoprotein E in HepG2 cells", *Journal of Lipid Research*. 40(1):39-49 (1999); Zhao Y, Mazzone T, "Transport and processing of endogenously
10 synthesized ApoE on the macrophage cell surface", *Journal of Biological Chemistry*, 275(7):4759-65 (2000))。

近年、発生工学的手法の進歩により様々な遺伝子転換マウスが作出され、アポE欠損マウスもその一つである。マウスは、本来動脈硬化発症が極めて稀な動物であるが、アポE欠損マウスは単一遺伝子の欠損のみで典型的なIII型高脂血症
15 を示すようになり、やがて動脈壁への脂質沈着を特徴とする粥状動脈硬化を自然発症することで知られる。

このマウスに対して、野生型マウスからの骨髓移植によりアポE産生マクロファージを導入すると動脈壁への脂質沈着を抑制することが認められている
(Linton MF, Atkinson JB, Fazio S. "Prevention of atherosclerosis in
20 apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation." *Science* 267:1034-1037 (1995); Boisvert W.A., Spangenberg J. & Curtiss L.K., "Treatment of severe hypercholesterolemia in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation.", *J. Clin. Invest.* 96, 1118-1124 (1995); Bellosto S, Mahley RW, Sanan DA, Murata J, Newland DL, Taylor JM,
25 Pitas RE., "Macrophage-specific expression of human apolipoprotein E reduces atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E-null mice.", *J Clin Invest* 96:2170-2179 (1995))。

逆に、野生型マウスにアポE欠損マウスの骨髓を移植することにより動脈壁への脂質沈着の亢進が認められている (Fazio S, Babaev V R, Murray, A B, Hasty

A H, Carter K J, Gleaves L A, Atkinson J B & Linton M F, "Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 4647-4652 (1997))。

5 これらの結果は、高脂血症状態への影響が認められない場合にも生じていることから、血清リポタンパク質の分布よりも、マクロファージからのアポEの分泌こそが直接的な動脈壁への脂質沈着抑制作用に重要である可能性が示唆される。

マクロファージでの微量のアポE発現によってアポE欠損により失われた血清のコレステロール排出能力が回復することや (Yenhong, Zhu, Stefano Bellosa, Claus Langer, Franco Bernini, Robert E. Pitas, Robert W. Mahley, Gerd
10 Assmann, and Arnold von Eckardstein, "Low-dose expression of a human apolipoprotein E transgene in macrophages restores cholesterol efflux capacity of apolipoprotein E-deficient mouse plasma" PNAS 95: 7585-7590 (1998))、コレステロール搬出の促進にマクロファージからアポEが分泌されることが重要であること (Lin CY, Duan H, Mazzone T, "Apolipoprotein
15 E-dependent cholesterol efflux from macrophages: kinetic study and divergent mechanisms for endogenous versus exogenous apolipoprotein E", Journal of Lipid Research. 40(9):1618-27 (1999)) から、上記の脂質沈着抑制作用において、マクロファージから分泌されるアポEが重要な役割を果たしていると考えられている。

20 コレステロール、特に遊離コレステロールは細胞において形質膜の構成成分として重要なほか、各種細胞内オルガネラの膜構成成分として重要な役割を果たしている。しかし、細胞内の過剰量の遊離コレステロールは、細胞機能を障害するため、アシル CoA : コレステロールアシルトランスフェラーゼ (acyl CoA: cholesterol acyltransferase) によりエステル化されコレステロールエステル
25 として細胞内に蓄積される。特に細胞がマクロファージであるときは、ステロール調節エレメント結合タンパク質 (Sterol Regulatory Element Binding Proteins) による発現制御を受けないスカベンジャーレセプター (Scavenger receptors) を発現するため、大過剰のコレステロールエステルをその内部に蓄積して泡沫細胞となる。蓄積されたコレステロールエステルは必要に応じて中性

コレステロールエステラーゼ (Neutral Cholesterol Esterase) によって遊離コレステロールに加水分解される。

すなわち、アポEが細胞からコレステロールを排出する場合、排出されるのは主として細胞膜上の遊離コレステロールと考えられるが、その遊離コレステロールの量を細胞膜上で一定に保とうとするために、細胞内のコレステロールエステルが加水分解を受けることになり、結果として、細胞全体のコレステロール含量が減少する。

急性心筋梗塞発症は、これまで、責任冠動脈での狭窄によって起こると考えられてきたが、最近の研究から、急性心筋梗塞発症前の責任冠動脈が有意な基質的狭窄を示す例は15%以下にすぎず、多くの症例において、急性心筋梗塞発症の原因は、いわゆる粥状動脈硬化プラークの破綻により生じる血栓形成の結果としての冠動脈閉塞であることが明らかになってきた。さらに、そのプラークの破綻による血栓形成が一過性で心筋梗塞まで至らないものが、不安定狭心症であることが明らかになった。

これら粥状動脈硬化プラークの破綻が原因で生じる血栓性の冠動脈閉塞により生じる一連の病態は、急性冠症候群 (Acute coronary syndrome, ACS) と呼ばれる (Davies MJ., "Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis, *Circulation*., 94:2013-2020 (1996); Libby P, "The molecular bases of the acute coronary syndromes", *Circulation*., 91:2844-2850 (1995); Falk E, Shah P, Fuster V, "Coronary plaque disruption", *Circulation*., 92:657-671 (1995)). このACSは、その原因から、粥状動脈硬化プラークを破綻しにくくできれば確実に抑制できる。

粥状動脈硬化プラークの破綻しやすさは、プラークの大きさや狭窄度とは関係なく、プラークの構成に密接な関係があることが明らかになってきた。破綻しやすい粥状動脈硬化プラークの最大の特徴の一つは、コレステロールエステルを大量に含んだマクロファージ由来の泡沫細胞からなる脂質コア (lipid-rich core) の存在である (Libby P, Clinton SK., "The role of macrophages in atherogenesis.", *Curr Opin Lipidol*. 4:355-363 (1993)) ので、脂質コア、すなわち泡沫細胞からコレステロールエステルを除去できれば、粥状動脈硬化プラ

ークを破綻しにくくできると考えられる。また、脂質コアでは細胞間隙にもコレステロールをはじめとした脂質の沈着が認められるが、これら脂質は、通常はマクロファージによって処理されるため、マクロファージ細胞内のコレステロール除去により、細胞間隙に沈着したコレステロールの除去が可能である。したがって、マクロファージの細胞内コレステロールの除去により、脂質コアからの効率のよい脂質除去が可能となる。

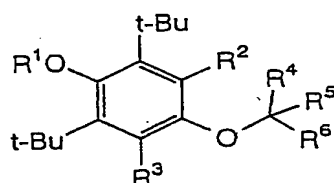
最近、この脂質コアに含まれる脂質の含量を低下させることで、実際に、粥状動脈硬化プラークを安定化させて破綻しにくくできることが示された。Aikawa Mらは、食餌中の脂質含量を低下させることにより、粥状動脈硬化プラークを安定化させて破綻しにくくした (Aikawa M, Rabkin E, Okada Y, Voglic SJ, Clinton SK, Brinckerhoff CE, Sukhova GK, Libby P, "Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: a potential mechanism of lesion stabilization. *Circulation*", 97(24):2433-44 (1998))。また、Crisbyらは、高脂血症治療剤であるHMG-CoA還元酵素阻害剤を投与して血清コレステロールを強力に低下させることにより粥状動脈硬化プラークを安定化させて破綻しにくくした (Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah P. K., Yano J., Zhu J., Nilsson J. (2001), "Pravastatin Treatment Increases Collagen Content and Decreases Lipid Content, Inflammation, Metalloproteinases, and Cell Death in Human Carotid Plaques": "Implications for Plaque Stabilization", *Circulation* 103: 926-933; Fukumoto Y., Libby P., Rabkin E., Hill C. C., Enomoto M., Hirouchi Y., Shiomi M., Aikawa M, "Statins Alter Smooth Muscle Cell Accumulation and Collagen Content in Established Atheroma of Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbits. *Circulation* 103: 993-999 (2001))。

アポEの分泌を促進させることができ、かつ上記のアポEによる血清のコレステロール排出促進作用を粥状動脈硬化プラークからのコレステロールの除去、即ち、粥状動脈硬化プラークの安定化に利用できれば、急性心筋梗塞や不安定狭心症などのACSの予防および治療が可能になると考えられる。

従来の技術

これまで、アポEの分泌を促進させる作用がある物質として、Liver X受容体(LXR)リガンドが報告されているが、臨床応用には至っていない。このため、局所でのアポE量の増加または血中アポE濃度の増加作用を有する、更なる薬剤の開発が望まれている。

一方、特開平6-206842号公報、その対応米国特許第5,574,178号および対応ヨーロッパ特許第0665208号には、式：



で表される化合物が抗酸化作用を有する化合物として開示されている。

また、特開平11-21238号公報、その対応米国特許第6,156,793号および対応ヨーロッパ特許出願第98917638.3号には、同化合物が動脈硬化症の予防および治療のための医薬組成物の有効成分として開示されている。

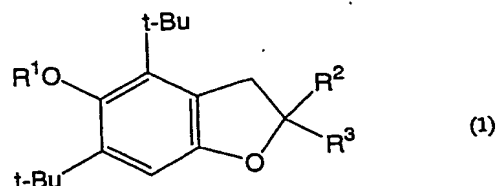
しかし、これら公報または特許には、同化合物が、アポEの分泌促進作用やそれによって細胞内脂質、特に細胞内コレステロール含量を低下させる作用を有することは開示されていない。

20 発明の開示

本発明は、アポEの分泌を促進させることにより細胞内脂質を除去することができる医薬組成物を提供する。

本発明者らは、一定の4,6-ジ-tert-ブチルジヒドロベンゾフラン誘導体が、細胞からのアポEの分泌を促進してアポEの血中あるいは臓器局所の濃度を増加させ、それにより細胞内脂質、特に細胞内コレステロール含量を低下させるということを発見した。

従って、本発明は、アポEの分泌を促進させるための医薬組成物であって、式(1)：



5 (式中、

R¹ は、水素原子、アシル基、またはアリールアルコキシカルボニル基であり；
そして

R² および R³ は、独立して、置換若しくは未置換のアルキル基、置換若しくは未置換のアルケニル基、または置換若しくは未置換のアルキニル基であるか、
10 または R² と R³ が一緒になってシクロアルキル基を形成してもよい。) で表される化合物を含んでなる組成物を提供する。

一つの態様においては、アポEの分泌により血中あるいは臓器局所においてアポEの濃度が増加され、それにより体内の細胞内脂質が除去される。

好ましい態様において、細胞内脂質は粥状動脈硬化プラークの脂質であり、より好ましくは、粥状動脈硬化プラークの脂質はコレステロールである。
15

より好ましい態様においては、粥状動脈硬化プラークの細胞内コレステロールを除去することで、粥状動脈硬化プラークが安定化されて粥状動脈硬化プラークの破綻が防止され、それにより急性心筋梗塞または不安定狭心症のような急性冠症候群の発生頻度が低減または症状が軽減される。

20 また、本発明は、式(1)で表される化合物を含んでなる、急性冠症候群の発生頻度を低減または症状を軽減するための医薬組成物も提供する。

更に、本発明は、式(1)で表される化合物を含んでなる、細胞内脂質含量を低下させるための医薬組成物も提供する。

更には、本発明は、アポリポタンパク質Eの分泌を促進する方法であって、そのような促進を必要とする患者に促進有効量の式(1)で表される化合物を投与
25 することを含んでなる方法を提供する。

また、本発明は、急性冠症候群の発生頻度を低減または症状を軽減する方法であって、そのような治療を必要とする患者に治療有効量の式(1)で表される化合物を投与することを含んでなる方法を提供する。

また、本発明は、細胞内脂質含量を低下させる方法であって、そのような治療を必要とする患者に治療有効量の式（１）で表される化合物を投与することを含んでなる方法を提供する。

- 更には、本発明は、上記の医薬組成物の製造における式（１）で表される化合物の使用も提供する。

図面の簡単な説明

- 図１は、BO-653処理および未処理のC57BL/6Jマウス由来泡沫化マクロファージおよびBO-653未処理のアポE欠損マウスマクロファージの培養培地についての抗マウスアポE抗体を用いたウェスタンブロッティングを示す。

- 図２は、BO-653を含有しない高脂肪食を与えたマウスおよびBO-653を0.65%含有する高脂肪食を与えたマウスの各個体のリポタンパク質画分のSDS-PAGEを示す。各レーンにおいて12.5 μ Lの血清に相当するリポタンパク質画分を泳動した。

発明を実施するための最良の形態

- 本発明の式（１）の化合物の R^1 は、水素原子、アシル基またはアリールアルコキシカルボニル基である。好ましいアシル基は、1～10の炭素原子を有するアシル基であり、その例としては、ホルミル、アセチル、プロピオニル、およびベンゾイル基が挙げらる。また、好ましいアリールアルコキシカルボニル基は、7～11の炭素原子を有するアリールアルコキシカルボニル基であり、その例として、ベンジルオキシカルボニルおよびナフチルメトキシカルボニル基が挙げられる。

- 好ましい R^1 は、水素原子およびアシル基であり、水素原子およびアセチル基がより好ましく、特に水素原子が好ましい。

式（１）の化合物の R^2 および R^3 は、独立して、置換若しくは未置換のアルキル基、置換若しくは未置換のアルケニル基、または置換若しくは未置換のアルキニル基である。

好ましいアルキル基は、1～20の炭素原子を有する直鎖または分岐鎖状のアルキル基であり、その例として、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、s-ブチル、t-ブチル、n-ペンチル、イソペンチル、sec-ペンチル、t-ペンチル、ネオペンチル、n-ヘキシル、イソヘキシル、エチルブチル、n-ヘプチル、イソヘプチル、エチルペンチル、n-オク
5 チル、エチルヘキシル、プロピルペンチル、ノニル、デシル、ペンタデシル、およびステアリル基が挙げられる。より好ましくは1～10の炭素原子を有する直鎖または分岐鎖状のアルキル基であり、特に3～8の炭素原子を有する直鎖状のアルキル基が好ましい。

10 好ましいアルケニル基は、2～20の炭素原子を有する直鎖または分岐鎖状のアルキル基であり、その例として、エテニル、プロペニル、イソプロペニル、ブテニル、イソブテニル、ペンテニル、イソペンテニル、ヘキセニル、イソヘキセニル、エチルブテニル、ヘプテニル、イソヘプテニル、エチルペンテニル、オクテニル、ノネニル、デセニル、およびペンタデセニル基が挙げられる。より好ま
15 しくは2～10の炭素原子を有する直鎖または分岐鎖状のアルケニル基であり、特に3～8の炭素原子を有する直鎖状のアルケニル基が好ましい。

好ましいアルキニル基は、2～20、好ましくは2～10の炭素原子を有する直鎖または分岐鎖状のアルキニル基であり、特に3～8の炭素原子を有する直鎖状のアルキニル基が好ましい。その例は、アルケニル基について挙げた例に対応
20 する。

R² と R³ は、一緒になって、5～10の炭素原子を有するシクロアルキル基を形成してもよい。好ましいシクロアルキル基の例として、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、シクロノニル、およびシクロデシルが挙げられる。

25 R² および R³ がアルキル基、アルケニル基、またはアルキニル基である場合に有することができる置換基の例として、ハロゲン、低級アルコキシ、ヒドロキシ、アミノ、ニトロ、およびトリフルオロメチル基が挙げられる。

好ましい R² および R³ は、3～8の炭素原子を有する直鎖状の未置換アルキル基であり、R² および R³ の双方がn-ペンチル基である場合が最も好ましい。

好ましい式(1)の化合物は:

- 4,6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジメチル-2,3-ジヒドロベンゾフラン;
- 4,6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジエチル-2,3-ジヒドロベンゾフラン;
- 5 4,6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジ-*n*-プロピル-2,3-ジヒドロベンゾフラン;
- 4,6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジ-イソプロピル-2,3-ジヒドロベンゾフラン;
- 10 4,6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジ-*n*-ブチル-2,3-ジヒドロベンゾフラン;
- 4,6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジ-*s*-ブチル-2,3-ジヒドロベンゾフラン;
- 4,6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジ-*t*-ブチル-2,3-ジヒドロベンゾフラン;
- 15 4,6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジ-*n*-ペンチル-2,3-ジヒドロベンゾフラン;
- 4,6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジ-*t*-ペンチル-2,3-ジヒドロベンゾフラン;
- 20 4,6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジ-イソペンチル-2,3-ジヒドロベンゾフラン;
- 4,6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジ-ネオペンチル-2,3-ジヒドロベンゾフラン;
- 4,6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジ-*n*-ヘキシル-2,3-ジヒドロベンゾフラン;
- 25 4,6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジ-*n*-ヘプチル-2,3-ジヒドロベンゾフラン;
- 4,6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジ-*n*-オクチル-2,3-ジヒドロベンゾフラン;

4,6-ジ-*tert*-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジ-*n*-ノニル-2,3-ジヒドロベンゾフラン; および

4,6-ジ-*tert*-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジ-*n*-デシル-2,3-ジヒドロベンゾフラン

- 5 である。特に好ましい式(1)の化合物は、4,6-ジ-*tert*-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジ-*n*-ペンチル-2,3-ジヒドロベンゾフランである。

本発明で用いられる式(1)で表される化合物は、たとえば、特開平6-206842号公報、その対応米国特許第5,574,178号または対応ヨーロッパ特許第0665208号に記載の方法によって合成することができる。

- 10 本発明において、アポEの濃度が局所的に増加される臓器として、血管内膜が挙げられる。特にマクロファージが多く局在する血管内膜においてアポEの濃度が局所的に増加する。血中のアポEの濃度は、アポE抗体を使用する免疫学的方法により測定することができる。一方、臓器局所におけるアポEの濃度は、アポE抗体を使用する免疫学的方法あるいはアポE遺伝子やその断片を用いたFIS
- 15 H法などの分子生物学的方法により測定することができる。

本発明における細胞内脂質とは、リン脂質、トリグリセリド、コレステロールエステルおよび遊離コレステロールのことで、特にコレステロールエステルと遊離コレステロールが主要な細胞内脂質である。これら脂質が蓄積される細胞は、典型的には、血管平滑筋細胞およびマクロファージ、特にマクロファージである。

- 20 また、細胞内脂質の除去とは、アポEが、細胞内あるいは細胞膜の脂質と幼若リポタンパク質を形成することにより、その脂質が細胞外に排除されることをいう。

本発明において粥状動脈硬化プラークとは、マクロファージ由来泡沫細胞および脂質コアを覆う平滑筋細胞からなる線維性被膜により形成される血管病変である。

- 25 粥状動脈硬化プラークの破綻とは、脂質コアを覆う平滑筋細胞からなる線維性被膜が破れることを意味する。破綻により泡沫細胞の表面に発現する組織因子(tissue factor)が血中に露出して血栓が形成される。この血栓形成が冠動脈で起こると、急性心筋梗塞や不安定狭心症が発症する。

本発明における粥状動脈硬化プラークの安定化とは、粥状動脈硬化プラーク中

の脂質コアの脂質含量を低下させることにより粥状動脈硬化プラークを破綻し難くすることをいう。

本発明の医薬組成物は、有効成分である式(1)で表される化合物に、投与経路に応じて、生理的に許容される固体または液体の製剤担体を配合し、各種の剤形に調製することができる。投与経路には、経口投与、静脈注射などの非経口投与、徐放性製剤による徐放性投与、および局所投与カテーテルなどによる局所投与がある。製剤担体には、通常用いられる賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、被覆剤、溶解補助剤、乳化剤、懸濁化剤、安定化剤、油脂および溶剤がある。剤形には、錠剤、顆粒剤、丸剤、カプセル剤、水剤、シロップ剤、懸濁剤、乳濁剤および注射剤がある。

本発明の式(1)で表される化合物の投与量は、患者の年齢、症状の重篤度、投与経路などによって適宜選択されるが、一日あたり成人で、例えば1~1000mg、好ましくは50~400mgである。この量は、1回に纏めて投与してもよく、数回に分けて投与してもよい。

以下に、実施例を示すが、それらは、本発明を例示するためのものであって、本発明の範囲を限定することを意図したものではない。

実施例

試験例1：アポE分泌促進作用と細胞内コレステロール低下作用

C57BL/6JマウスおよびアポE欠損マウスそれぞれから4.05w/v%チオグリコレート刺激腹腔渗出細胞を調製した。これを 1.0×10^5 細胞/ウェルで12-ウェルプレートに播いた。5容量%のCO₂の存在下で37℃で培養した。培養3時間後に培地を交換することにより非接着細胞を除去して、各ウェル中にマウス腹腔マクロファージを得た。翌日、このマウス腹腔マクロファージを50μgプロテイン/mLアセチル化LDL含有培地で24時間培養して泡沫化させた。

C57BL/6Jマウス由来の泡沫化マクロファージの各ウェルに4,6-ジ-*tert*-ブチル-2,2-ジペンチル-5-ヒドロキシ-2,3-ジヒドロベンゾフラン(BO-653)をそれぞれ最終濃度が0,3および10μmol/Lとな

るように添加した。24時間培養した後、培地を回収してSDS-PAGE試料を調製した。

このSDS-PAGE試料を10w/v%SDS-PAGEで分離してから、セミドライ法によりニトロセルロース紙に転写し、ブロッキング(10w/v% スキムミルク, 0.1容量% Tween-20含有TBS)した。1次抗体としてウサギ抗マウスアポE抗体(#K23100R, BIODSIGN)を用い、2次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体(#7071-1, Cell Signaling TECHNOLOGY)を用い、化学発光法(PIERCE)でアポEを検出した。結果を図1に示す。

図1から分かるように、BO-653を添加した試料では、培地中の糖化型アポEの増加が認められた。なお、糖化型アポEのバンドはアポE欠損マウス由来のマクロファージでは認められなかった。

一方、培地と同時に回収したBO-653処理後の泡沫化マクロファージから、ヘキサン/2-プロパノール(容量比3:2)の混合溶媒を用いて脂質を抽出した。酵素法(Yoshiki Kawabe et al., "Oxidation-Induced Aggregation of Rabbit Low-Density Lipoprotein by Azo Initiator." Archives of Biochemistry and Biophysics 310, 489-496 (1994))により、この脂質中の総コレステロールを測定し、その値を細胞内コレステロール含量とした。表1に、BO-653処理による細胞内コレステロール含量の減少率を、使用したビヒクルに対するパーセントで示す。BO-653を添加した試料では、細胞内コレステロール含量が低下している。

表1: 細胞内コレステロール含量の減少率

BO-653 ($\mu\text{mol/L}$)	コレステロール減少率(%)	
	平均値	標準偏差
0 (ビヒクル)	100.0	6.9
3	132.6	23.1
10	145.9	28.1

試験例 2 : マウス血清アポE増加作用

7週齢のC57BL/6Jマウスを3匹と4匹からなる第1および第2グループに分け、第1グループにはBO-653を含有しない高脂肪食を与え、第2グループにはBO-653を0.65%含有する高脂肪食を与えた。5週間飼育した時点でエーテル麻酔下に下行大静脈より採血した。各個体の血液から血清を調製し、その100 μ Lを超遠心用試験管に入れた。比重1.256の臭化ナトリウム水溶液900 μ Lを加え、卓上型超遠心機TL-100でTLA-100.2ローターを用いて100,000rpmで20時間遠心した。得られたリポタンパク質画分を10w/v%トリクロロ酢酸水溶液で処理し、生成した沈殿で80 μ LのSDS-PAGE試料を調製した。このうち10 μ Lを15w/v%SDS-PAGEにかけ、クマシーブルー染色を行った。分子量からアポEを同定した。結果を図2に示す。

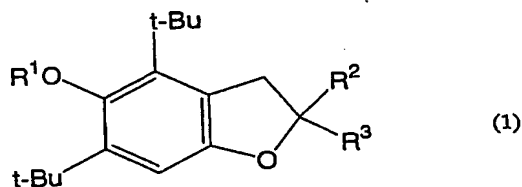
図2から分かるように、第2グループのアポEは第1グループに比べ増加している。

上記のように、特開平11-21238号公報およびその対応外国特許には、式(1)の化合物が動脈硬化症の予防および治療のための医薬組成物の有効成分として開示されている。しかし、その公報には、その試験例から分かるように、式(1)の化合物は、動脈硬化病変の形成を直接抑制する化合物として記載されている。これに対し、本発明では、式(1)の化合物は、アポEの分泌→アポEによるコレステロール除去→末端の疾患の抑制という作用機序により末端の疾患に作用する。その結果、急性心筋梗塞または不安定狭心症という動脈硬化症とは異なる疾患の抑制が期待される。従って、本発明における式(1)の化合物の薬理作用は、上記公報に開示されたものとは明らかに異なるものである。

請求の範囲

1. アポリポタンパク質Eの分泌を促進するための医薬組成物であって、式
(1) :

5



(式中、

10 R¹ は、水素原子、アシル基、またはアリールアルコキシカルボニル基であり；
そして

R² および R³ は、独立して、置換若しくは未置換のアルキル基、置換若しくは未置換のアルケニル基、または置換若しくは未置換のアルキニル基であるか、または R² と R³ が一緒になってシクロアルキル基を形成してもよい。)

15 で表される化合物を含んでなる組成物。

2. アポリポタンパク質Eの分泌が、血中あるいは臓器局所においてアポリポタンパク質Eの濃度を増加させる、請求項1記載の組成物。

3. アポリポタンパク質Eの濃度の増加により細胞内脂質が除去される、請求項1記載の組成物。

20 4. 細胞内脂質が粥状動脈硬化プラークの脂質である、請求項3記載の組成物。

5. 細胞内脂質の除去が、粥状動脈硬化プラークを安定化させて前記粥状動脈硬化プラークの破綻を防止する、請求項4記載の組成物。

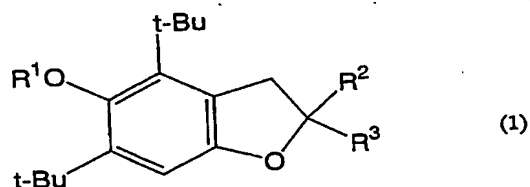
6. 細胞内脂質が遊離コレステロールまたはコレステロールエステルである、
25 請求項3記載の組成物。

7. 粥状動脈硬化プラークの破綻防止が、急性冠症候群の発生頻度の低減または症状の軽減をもたらす、請求項5記載の組成物。

8. 急性冠症候群が、急性心筋梗塞または不安定狭心症である、請求項7記載の組成物。

9. 式(1)で表される化合物が4,6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジ-*n*-ペンチル-2,3-ジヒドロベンゾフランである、請求項1記載の組成物。

10. 急性冠症候群の発生頻度を低減または症状を軽減するための医薬組成物であって、式(1)：



10 (式中、

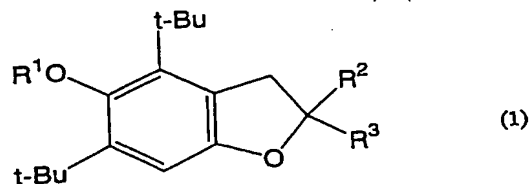
R^1 は、水素原子、アシル基、またはアリールアルコキシカルボニル基であり；
そして

R^2 および R^3 は、独立して、置換若しくは未置換のアルキル基、置換若しくは未置換のアルケニル基、または置換若しくは未置換のアルキニル基であるか、
15 または R^2 と R^3 が一緒になってシクロアルキル基を形成してもよい。) で表される化合物を含んでなる組成物。

11. 急性冠症候群が、急性心筋梗塞または不安定狭心症である、請求項10記載の組成物。

12. 式(1)で表される化合物が4,6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジ-*n*-ペンチル-2,3-ジヒドロベンゾフランである、請求項10
20 に記載の組成物。

13. 細胞内脂質含量を低下させるための医薬組成物であって、式(1)：



25

(式中、

R^1 は、水素原子、アシル基、またはアリールアルコキシカルボニル基であり；
そして

R^2 および R^3 は、独立して、置換若しくは未置換のアルキル基、置換若しくは未置換のアルケニル基、または置換若しくは未置換のアルキニル基であるか、または R^2 と R^3 が一緒になってシクロアルキル基を形成してもよい。) で表される化合物を含んでなる組成物。

5 14. 細胞内脂質が粥状動脈硬化プラークの脂質である、請求項13記載の組成物。

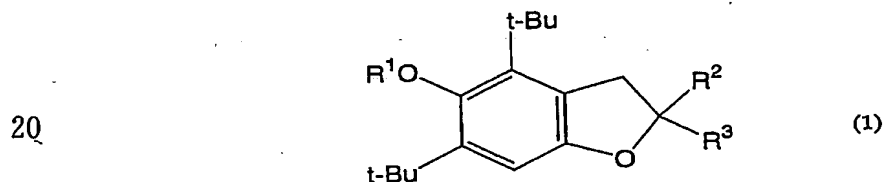
15. 細胞内脂質が遊離コレステロールまたはコレステロールエステルである、請求項13記載の組成物。

10 16. 細胞内脂質含量の低下が、粥状動脈硬化プラークの破綻を防止する、請求項13記載の組成物。

17. 粥状動脈硬化プラークの破綻防止が、急性冠症候群の発生頻度の低減または症状の軽減をもたらす、請求項16記載の組成物。

15 18. 式(1)で表される化合物が4,6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジ-*n*-ペンチル-2,3-ジヒドロベンゾフランである、請求項13記載の組成物。

19. アポリボタンパク質Eの分泌を促進する方法であって、そのような促進を必要とする患者に促進有効量の式(1)：



(式中、

R^1 は、水素原子、アシル基、またはアリールアルコキシカルボニル基であり；そして

25 R^2 および R^3 は、独立して、置換若しくは未置換のアルキル基、置換若しくは未置換のアルケニル基、または置換若しくは未置換のアルキニル基であるか、または R^2 と R^3 が一緒になってシクロアルキル基を形成してもよい。) で表される化合物を投与することを含んでなる方法。

20. アポリボタンパク質Eの分泌が、血中あるいは臓器局所においてアポリ

ボタンパク質Eの濃度を増加させる、請求項19記載の方法。

21. アポリボタンパク質Eの濃度の増加により細胞内脂質が除去される、請求項20記載の方法。

22. 細胞内脂質が粥状動脈硬化プラークの脂質である、請求項21記載の方法。

23. 細胞内脂質の除去が、粥状動脈硬化プラークを安定化させて前記粥状動脈硬化プラークの破綻を防止する、請求項22記載の方法。

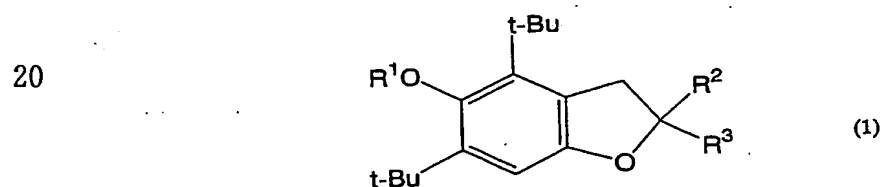
24. 細胞内脂質が遊離コレステロールまたはコレステロールエステルである、請求項21記載の方法。

25. 粥状動脈硬化プラークの破綻防止が、急性冠症候群の発生頻度の低減または症状の軽減をもたらす、請求項23記載の方法。

26. 急性冠症候群が、急性心筋梗塞または不安定狭心症である、請求項25記載の方法。

27. 式(1)で表される化合物が4,6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジ-*n*-ペンチル-2,3-ジヒドロベンゾフランである、請求項19記載の方法。

28. 急性冠症候群の発生頻度を低減または症状を軽減する方法であって、そのような治療を必要とする患者に治療有効量の式(1)：



(式中、

R¹ は、水素原子、アシル基、またはアリールアルコキシカルボニル基であり；

25 そして

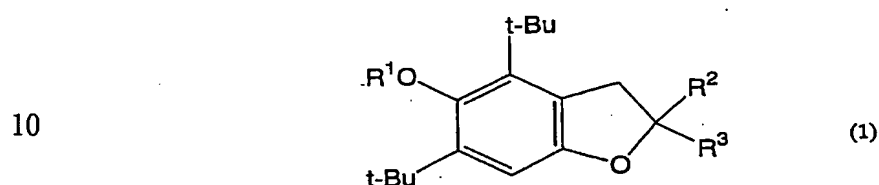
R² および R³ は、独立して、置換若しくは未置換のアルキル基、置換若しくは未置換のアルケニル基、または置換若しくは未置換のアルキニル基であるか、または R² と R³ が一緒になってシクロアルキル基を形成してもよい。)

で表される化合物を投与することを含んでなる方法。

29. 急性冠症候群が、急性心筋梗塞または不安定狭心症である、請求項28記載の方法。

30. 式(1)で表される化合物が4,6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジ-*n*-ペンチル-2,3-ジヒドロベンゾフランである、請求項285記載の方法。

31. 細胞内脂質含量を低下させる方法であって、そのような治療を必要とする患者に治療有効量の式(1)：



(式中、

R¹ は、水素原子、アシル基、またはアリールアルコキシカルボニル基であり；
そして

15 R² および R³ は、独立して、置換若しくは未置換のアルキル基、置換若しくは未置換のアルケニル基、または置換若しくは未置換のアルキニル基であるか、または R² と R³ が一緒になってシクロアルキル基を形成してもよい。) で表される化合物を投与することを含んでなる方法。

20 32. 細胞内脂質が粥状動脈硬化プラークの脂質である、請求項31記載の方法。

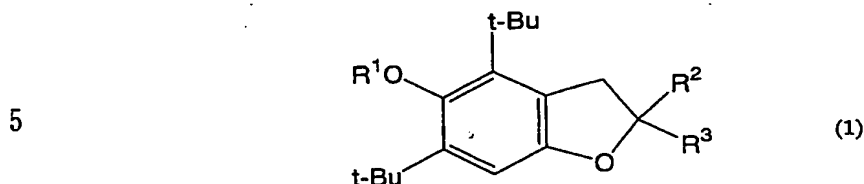
33. 細胞内脂質が遊離コレステロールまたはコレステロールエステルである、請求項31記載の方法。

34. 細胞内脂質含量の低下が、粥状動脈硬化プラークの破綻を防止する、請求項31記載の方法。

25 35. 粥状動脈硬化プラークの破綻防止が、急性冠症候群の発生頻度の低減または症状の軽減をもたらす、請求項34記載の方法。

36. 式(1)で表される化合物が4,6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジ-*n*-ペンチル-2,3-ジヒドロベンゾフランである、請求項31記載の方法。

37. アポリポタンパク質Eの分泌を促進するための医薬組成物の製造における、式(1)：



(式中、

R¹ は、水素原子、アシル基、またはアリールアルコキシカルボニル基であり；
そして

10 R² および R³ は、独立して、置換若しくは未置換のアルキル基、置換若しくは未置換のアルケニル基、または置換若しくは未置換のアルキニル基であるか、または R² と R³ が一緒になってシクロアルキル基を形成してもよい。) で表される化合物の使用。

15 38. アポリポタンパク質Eの分泌が、血中あるいは臓器局所においてアポリポタンパク質Eの濃度を増加させる、請求項37記載の使用。

39. アポリポタンパク質Eの濃度の増加により細胞内脂質が除去される、請求項38記載の使用。

40. 細胞内脂質が粥状動脈硬化プラークの脂質である、請求項39記載の使用。

20 41. 細胞内脂質の除去が、粥状動脈硬化プラークを安定化させて前記粥状動脈硬化プラークの破綻を防止する、請求項40記載の使用。

42. 細胞内脂質が遊離コレステロールまたはコレステロールエステルである、請求項39記載の使用。

25 43. 粥状動脈硬化プラークの破綻防止が、急性冠症候群の発生頻度の低減または症状の軽減をもたらす、請求項41記載の使用。

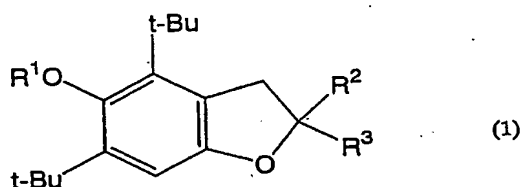
44. 急性冠症候群が、急性心筋梗塞または不安定狭心症である、請求項43記載の使用。

45. 式(1)で表される化合物が4,6-ジ-tert-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジ-n-ペンチル-2,3-ジヒドロベンゾフランである、請求項37

記載の使用。

46. 急性冠症候群の発生頻度を低減または症状を軽減するための医薬組成物の製造における、式(1)：

5



(式中、

R¹ は、水素原子、アシル基、またはアリールアルコキシカルボニル基であり；

10

そして

R² および R³ は、独立して、置換若しくは未置換のアルキル基、置換若しくは未置換のアルケニル基、または置換若しくは未置換のアルキニル基であるか、または R² と R³ が一緒になってシクロアルキル基を形成してもよい。)

で表される化合物の使用。

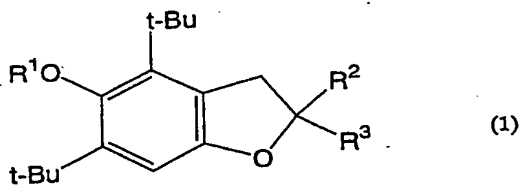
15

47. 急性冠症候群が、急性心筋梗塞または不安定狭心症である、請求項46記載の使用。

48. 式(1)で表される化合物が4,6-ジ-tert-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジ-n-ペンチル-2,3-ジヒドロベンゾフランである、請求項46に記載の使用。

20

49. 細胞内脂質含量を低下させるための医薬組成物の製造における、式(1)：



25

(式中、

R¹ は、水素原子、アシル基、またはアリールアルコキシカルボニル基であり；

そして

R² および R³ は、独立して、置換若しくは未置換のアルキル基、置換若しくは未置換のアルケニル基、または置換若しくは未置換のアルキニル基であるか、

または R^2 と R^3 が一緒になってシクロアルキル基を形成してもよい。) で表される化合物の使用。

50. 細胞内脂質が粥状動脈硬化プラークの脂質である、請求項49記載の使用。

5 51. 細胞内脂質が遊離コレステロールまたはコレステロールエステルである、請求項49記載の使用。

52. 細胞内脂質含量の低下が、粥状動脈硬化プラークの破綻を防止する、請求項49記載の使用。

10 53. 粥状動脈硬化プラークの破綻防止が、急性冠症候群の発生頻度の低減または症状の軽減をもたらす、請求項52記載の使用。

54. 式(1)で表される化合物が4,6-ジ-*tert*-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジ-*n*-ベンチル-2,3-ジヒドロベンゾフランである、請求項49記載の使用。

図 1

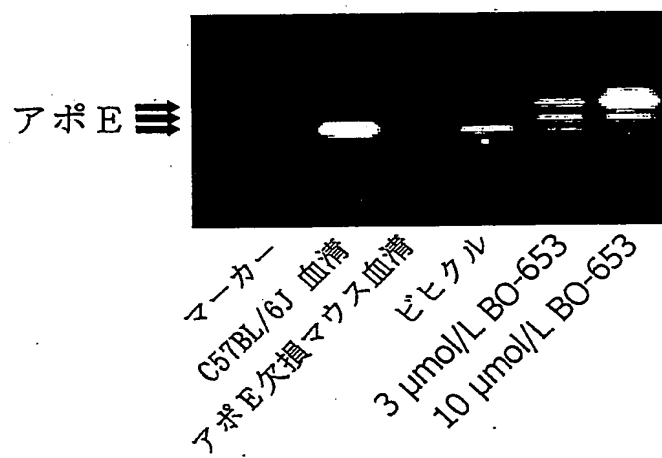
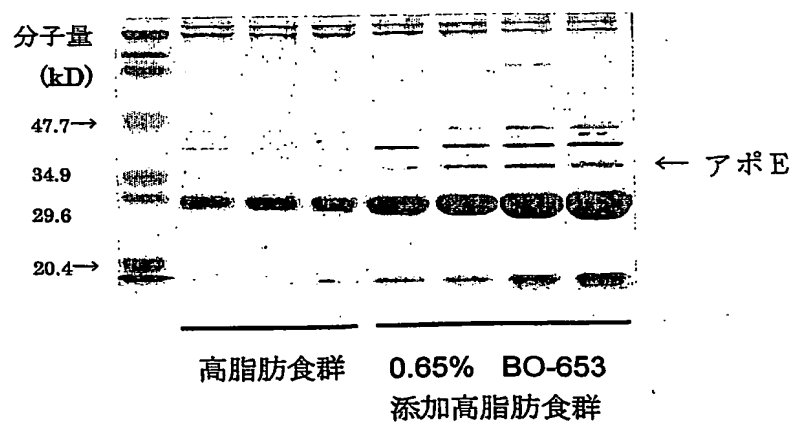


図 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08807

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K31/343, A61P3/06, 9/10, 43/00, C07D307/79

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K31/343, C07D307/79

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 6-206842 A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 26 July, 1994 (26.07.94), Full text & US 5574178 A	1-18, 37-54
X	JP 11-21238 A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 26 January, 1999 (26.01.99), Full text & US 6156793 A	1-18, 37-54

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
15 November, 2002 (15.11.02)

Date of mailing of the international search report
03 December, 2002 (03.12.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08807

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 19-36

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in claims 19 to 36 pertain to methods for treatment of the human body by therapy.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO2/08807

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ A61K31/343, A61P3/06, 9/10, 43/00, C07D307/79

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ A61K31/343, C07D307/79

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 6-206842 A (中外製薬株式会社) 1994. 07. 26, 全文 & US 557 4178 A	1-18, 37-54
X	JP 11-21238 A (中外製薬株式会社) 1999. 01. 26, 全文 & US 615 6793 A	1-18, 37-54

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
15. 11. 02

国際調査報告の発送日
03.12.02

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
内藤 伸一



4 P 3230

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 19-36 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲 19-36 の発明は、治療による人体の処置方法に関するものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。